

## *Rhizopus* 属菌の培養液より製造したファームジョイ 中の植物ホルモンの同定および定量<sup>\*1</sup>

杉 山 民 二

(1990年6月26日受理)

Mass Spectrometric Determination of Phytohormones in the Aqueous  
Extract (Farmjoy) from the Koji prepared with *Rhizopus* sp.

Tamizi SUGIYAMA

### Summary

Koji with *Rhizopus oryzae* was prepared in steamed polished rice. The aqueous extract from the koji was named as farmjoy. The farmjoy was stimulated the growth of some agricultural crops. In order to examine the correlation between the effects and phytohormones in the farmjoy, indoleacetic acid (IAA), zeatin (Z), ribosylzeatin (RZ), N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine (iPA) and abscisic acid (ABA) were determined by mass spectrometry using deuterium-labeled standards. Gibberellins was also examined by mean of bioassay with microdrop method using dwarf rice plant (Tan-ginbouzu).

The concentrations of IAA, *cis*-RZ, *trans*-RZ and iPA in the farmjoy were 400 nM, 7.18 nM, 1.03 nM and 3.97 nM, respectively. ABA and GAs were not detected. The Plant growth activity of the farmjoy seems to be based on IAA and cytokinins characterized.

### 緒 言

高等植物の成長・分化に重要な役割を果たしている植物ホルモンは、植物自身のみでなく、微生物においても生産されている。例えば、イネ馬鹿苗病菌 *Gibberella fujikuroi* がジベレリン<sup>1)</sup>、*Agrobacterium tumefaciens* がサイトカイニン<sup>2)</sup>を生産している。また、Thimann は *Rhizopus suinus* の培養液からインドール酢酸の単離を報告している<sup>3)</sup>。

最近、*Rhizopus* 属菌の培養液（ファームジョイ）が植物成長調節剤として、イネの育苗、ホウレンソウ、テンサイなどの農作物に利用されている<sup>4)</sup>。

本研究では、この成長調節作用に植物ホルモンが関与しているか否かを明らかにする目的で、

<sup>\*1</sup> 本研究は東京農工大学農学部で行った。内容の一部は昭和62年度植物化学調節学会で発表した。

ファームジョイ中のインドール酢酸 (IAA), サイトカイニン類 (CKs), アブジジン酸 (ABA) を重水素標識化合物を内部標準 (IS) とするガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) により同定・定量した。さらに、ジベレリン類 (GAs) については生物検定法により検討した。

## 実 験

- (1) **ファームジョイの調製**: 精白碎米 1 kg を煮炊し, 水 400 ml とよく混和して, これに *Rhizopus oryzae* (微工研寄菌第7159号) を植付けた。30°C で48時間, 35°C で48時間さらに 40°C で24時間発酵して得た麴に水 1 l を加えて自然沕過した。本培養沕液をファームジョイ原液とした。
- (2) **植物ホルモンの精製**: 精製手順を Fig. 1, 3, 6 および 8 にまとめた。
- (3) **生物検定**: ①サイトカイニン活性は *Amaranthus betacyanin* 検定法により調べた<sup>5)</sup>。  
②ジベレリン活性は矮性イネ (短銀坊主) を用いて, 点滴法により測定した<sup>6)</sup>。
- (4) **高速液体クロマトグラフィー (HPLC)**: UV 検出器を付置した島津 LC-3 A を用いた。図に記述した溶媒系を用いて, 溶出はいずれも 2 ml/min で行った。
- (5) **ガスクロマトグラフ・質量分析計**: 多重イオン検出器を付置した島津 LKB-9000 を使用した。GC の分析条件は Fig. 2, 5 および 7 に記述した。選択イオンモニター (SIM) に用いたイオンを Table 1 にまとめた。

**Table 1** Ions Monitored for Quantitative Measurements

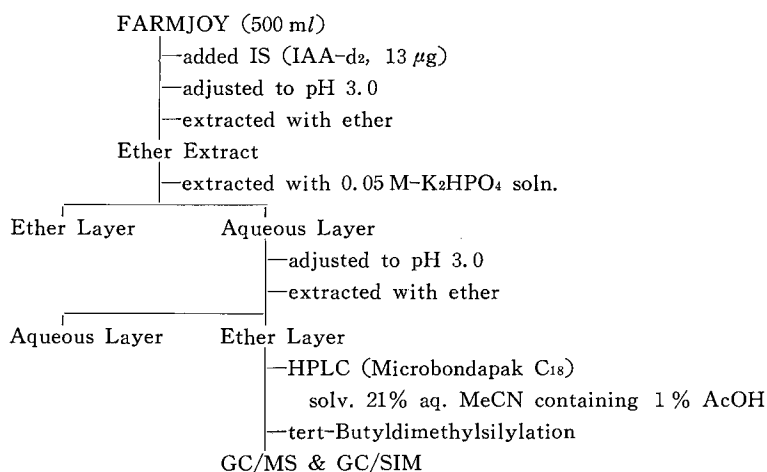
| Compound    | Ion identity        | m/z       |          |
|-------------|---------------------|-----------|----------|
|             |                     | Unlabeled | Standard |
| iPA-3 TMS   | M <sup>+</sup>      | 551       | 557      |
| Z-3 TMS     | M <sup>+</sup>      | 435       | 440      |
| RZ-4 TMS    | [M-15] <sup>+</sup> | 624       | 629      |
| IAA-2 tBDMS | M <sup>+</sup>      | 403       | 405      |
| ABA-tBDMS   | [M-57] <sup>+</sup> | 321       | 327      |

- (6) **揮発性誘導体の調製**: IAA および ABA はアセトニトリル (40  $\mu$ l) に溶解し, これに *N*-(tert-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (東京化成工業, 20  $\mu$ l) を加えて 80°C, 20 分間加熱し, *t*-BDMS 誘導体とした。CKs は Hexamethyldisilazane (10  $\mu$ l)-Trimethylchlorosilane (5  $\mu$ l)-Pyridine (35  $\mu$ l) に溶解し, 120°C, 1 時間加熱して TMS 誘導体とした。
- (7) **重水素標識化合物の調製**: IAA-d<sub>2</sub><sup>7)</sup>, ABA-d<sub>6</sub><sup>8)</sup> およびゼアチン (Z-d<sub>6</sub>), リボシルゼアチン (RZ-d<sub>5</sub>) と *N*<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン (iPA-d<sub>6</sub>)<sup>9)</sup> は前報<sup>7-9)</sup> に示した合成法により調製した。

## 結 果

### 1. IAA の同定・定量

ファームジョイ原液 (500 ml) に IS として IAA- $d_2$  を 13  $\mu$ g 添加した。Fig. 1 に示したスキームに従って IS を回収・精製し、IS 相当画分 (IS とともに内生 IAA を含む) を調製した。本画分を *t*-BDMS 誘導体にして GC-MS 分析に供した。Fig. 2 の TIM に GC クロマトグラムを示した。矢印 (合成標品の保持時間,  $R_t$ ) で MS スペクトルを測定した。その MS スペクトルには,  $m/z$  405 および 403 にそれぞれ IAA- $d_2$ ・2 *t*-BDMS および IAA・2 *t*-BDMS の親イオン ( $M^+$ ) が, さらに特徴的なフラグメントイオンが観察された。これらの結果よりファームジョイに IAA の存在が確認された。 $M^+$  イオンの  $m/z$  405 と 403 を用いて GC-SIM を行った。SIM クロマトグラムより  $m/z$  405 に対する  $m/z$  403 のイオン高の比率を求めた。このピーク高比をあらかじめ作成した検量線で IS 中の IAA- $d_0$  体の寄与を補正して IAA 含

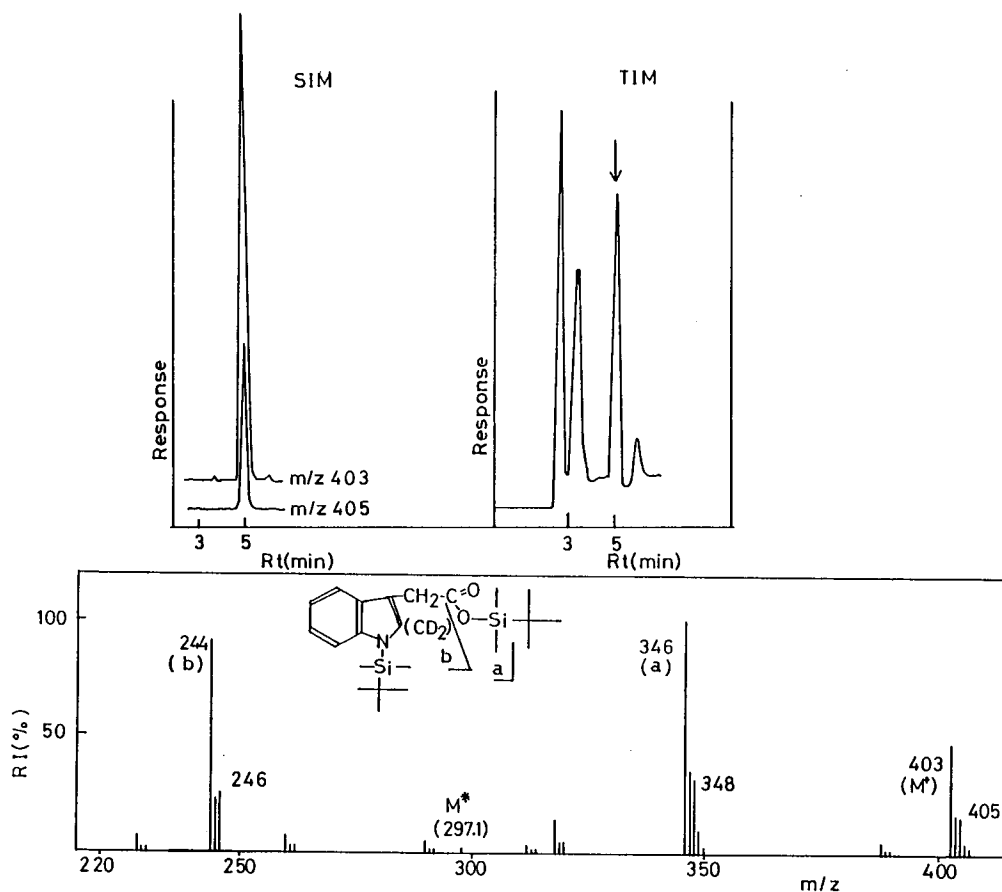


**Fig. 1** Purification procedures of IAA in the farmjoy

**Table 2** Phytohormones Found in the Farmjoy

| Phytohormone      | Content (ng/ml)  | Concentration (nM) |
|-------------------|------------------|--------------------|
| IAA               | 70.2             | 400                |
| iPA               | 1.33             | 3.97               |
| RZ <i>cis</i> -   | 2.52             | 7.18               |
| RZ <i>trans</i> - | 0.36             | 1.03               |
| Z                 | a                |                    |
| ABA               | n. d.            |                    |
| GAs               | n. d. (bioassay) |                    |

a : measurement not made.    n. d. : not detected



**Fig. 2** Mass spectrum, TIM and SIM of t-BDMS derivatives of IAA recovered from the farmjoy.

GC conditions : 1.5% OV-1, 1 m, 30 ml/min, He, column temp. 210°C.

量を算出した。IAA レベルは Table 2 に示した。

## 2. CKs の同定・定量

ファームジョイ中の CKs 化学種を生物検定に基づいて検索した。まず、ファームジョイ原液 (500 ml) を用いて、IS を添加しないで Fig. 3 のスキームに従い精製した。CK 活性は陽イオン交換クロマトグラフィーにおけるアンモニア溶出液に認められた。Sep-pak カートリッジ処理後、40% メタノールで HPLC を行った。この溶出液を 2 分ごとに集めた。CK 活性は Fig. 4 に示したように Rt 4 ~ 6 分および 18 ~ 22 分の溶出液に検出された。既知 CK の Rt との比較により、前者の活性は Z と RZ、後者は iPA によるものと推定された。

この結果をふまえて、ファームジョイ原液 1 l に Z-d<sub>5</sub>, RZ-d<sub>5</sub> および iPA-d<sub>5</sub> を各々一定量添加した。Fig. 3 の手順に従って IS を回収した。最終的に IS 相当画分を TMS 誘導体にし

FARMJOY (1,000 ml)  
 —added IS (Z-ds, 2.1  $\mu\text{g}$ ; RZ-ds, 2.3  $\mu\text{g}$ ; iPA-d<sub>6</sub>, 1.6  $\mu\text{g}$ )  
 —extracted with 1-BuOH  
 BuOH Extract  
 —evaporated to dryness under 45°C  
 —dissolved with distilled water  
 Aqueous Solution  
 —Dowex 50w $\times$ 8 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pH 3.2)  
 —eluted with 3 N-NH<sub>4</sub>OH  
 Effluent  
 —evaporated to dryness  
 —SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge  
 —eluted with 40% aq. MeOH  
 —HPLC (Microbondapak C<sub>18</sub>)  
   solv. 1, 40% aq. MeOH  
   solv. 2, 15% aq. MeCN  
   solv. 3, 30% aq. MeOH  
 —trimethylsilylation  
 GC/MS & GC/SIM

Fig. 3 Purification procedures of cytokinins in the farmjoy

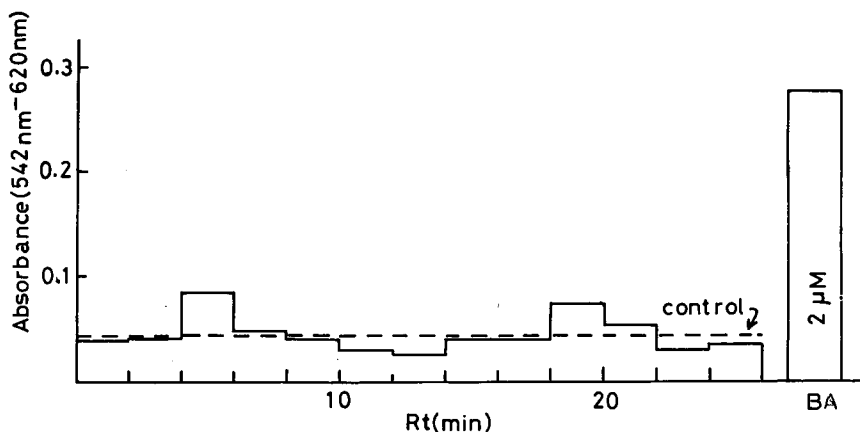
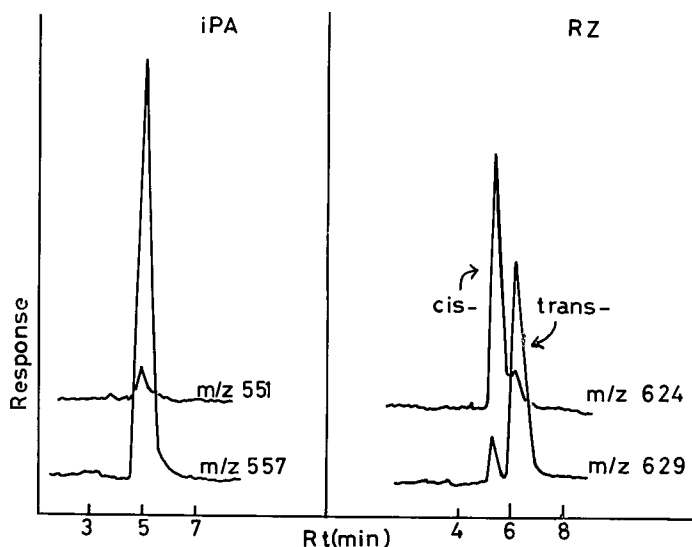


Fig. 4 Histogram of *Amaranthus* betacyanin bioassay of cytokinins fraction from the farmjoy.

て GC-MS および GC-SIM を行った。その SIM クロマトグラムを Fig. 5 に示した。iPA, *cis*-RZ および *trans*-RZ が同定されたが、Z は共雑成分の影響により測定できなかった。これらの化合物含量を IAA の場合と同様にして算出した。Table 2 にそれらのレベルを示した。

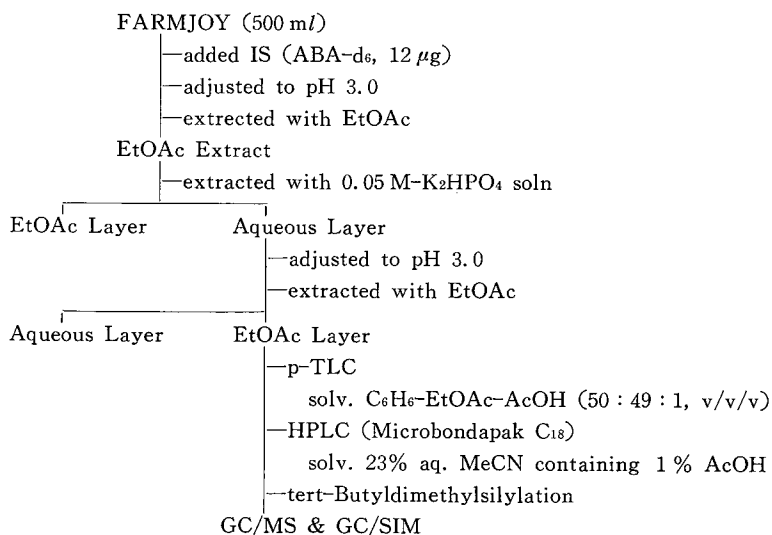
### 3. ABA の同定・定量

ファームジョイ原液 (500 ml) に IS として ABA-d<sub>6</sub> を 12  $\mu\text{g}$  添加した。Fig. 6 に示した



**Fig. 5** SIM chromatograms of TMS derivatives iPA and RZ recovered from the farmjoy.

GC conditions: 1.5% OV-1, 1 m, 30 ml/min. He, column temp. 240°C (iPA), 260°C (RZ), 215°C (Z).

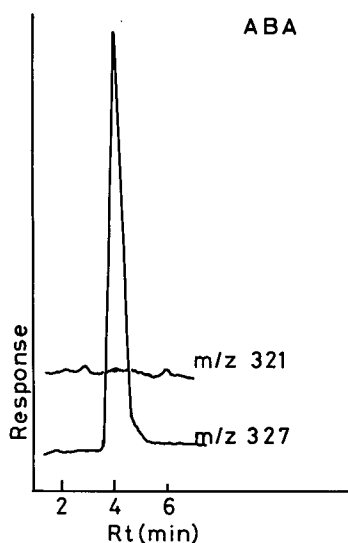


**Fig. 6** Purification procedures of ABA in the farmjoy

スキームで IS を回収・精製した。IS 相当画分を *t*-BDMS 誘導体として GC-MS および GC-SIM を行った。Fig. 7 に SIM クロマトグラムを示したが、内生 ABA に基づくイオン ( $m/z$  321) は確認できなかった。したがって、ABA はファームジョイ中に検出されなかった。

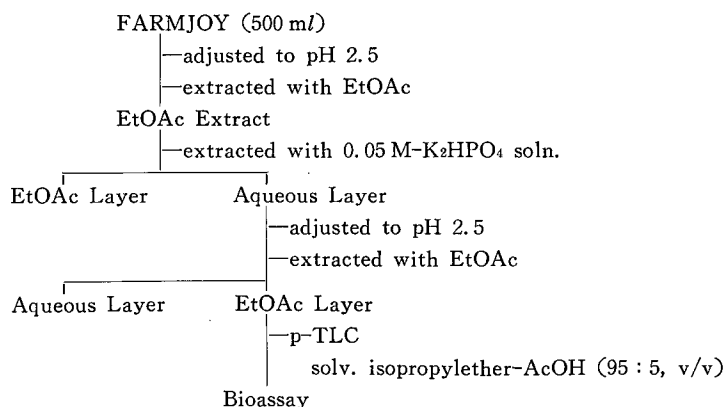
#### 4. GAs の同定・定量

ファームジョイ原液 (500 ml) を Fig. 8 に示したスキームに従って精製した。酸性酢酸エチル画分を薄層クロマトグラフィーに供し、その展開部を10等分に分画した。各画分を50%アセトンで溶出し、その溶出液を減圧下で乾固した。その乾固物を 100  $\mu$ l の50%アセトンで再溶解して生物検定試料とした。本溶液 1  $\mu$ l を矮性イネ短銀坊主の幼葉鞘と第一葉との間に点滴した。その結果を Fig. 9 に示した。いずれの画分にも GA<sub>3</sub> 0.1 mg 以上に対応す活性を検出できなかった。従って、ファームジョイに GAs を同定できなかった。



**Fig. 7** SIM chromatogram of t-BDMS derivatives of ABA recovered from the farmjoy.

GC conditions: 1.5% OV-1, 1 m, 30 ml/min. He, column. temp. 190°C.



**Fig. 8** Purification procedures of GAs in the farmjoy

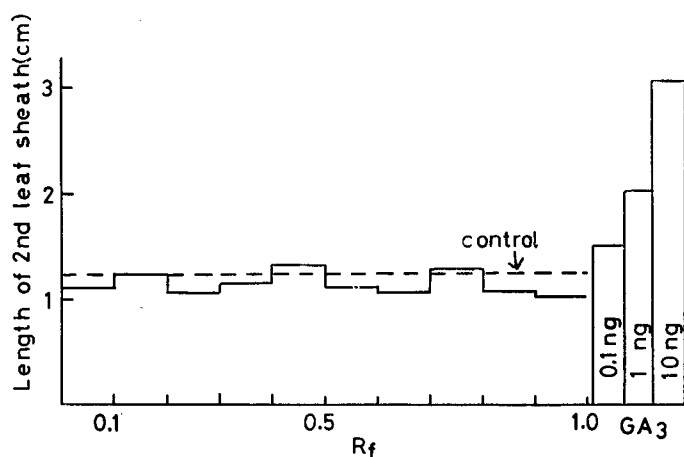


Fig. 9 Histogram of dwarf rice (Tan-ginbouzu) bioassay of GA fraction from the farmjoy

## 考 察

ファームジョイ原液の 300 倍希釈液をイネ、ハウレンソウなどの農作物に葉面散布すること、茎葉乾物重を数～十数%増加させること、また葉色値を高めることが観察されている<sup>4)</sup>。植物個体への IAA 処理では、IAA 濃度が 0.1～1 nM で根、1～10 nM で芽および 1～10  $\mu$ M で茎の成長を促進することが報告されている<sup>10)</sup>。ファームジョイ中の IAA は、そのレベルより農作物の根および芽の成長促進に関与していることが示唆された。CKs は 5～500 nM でイネ葉のクロロフィル保持作用を発現する<sup>11)</sup>。ファームジョイ原液の総 CKs レベルは 11 nM であり、CKs のみが葉色値の向上に働いている可能性は小さいものと推察される。

以上の結果より、ファームジョイの成長促進作用は、IAA 単独の作用だけでなく、IAA と CKs の複合的な効果によるものと考えられた。

## 謝 辞

ファームジョイを供与して頂いた北野正一氏（アバンス興業）、分析にアドバイスされた田中正男氏（千葉県工業試験所）に深謝します。

## 文 献

- 1) 田村三郎：「ジベレリン」東大出版会，1969年
- 2) 其木茂則，大野陽子，杉山民二，飯塚宗夫，橋爪 斌，日化誌，**1981**，899.
- 3) Thimann, K. V. : *J. Biol. Chem.*, **109**, 279 (1935).
- 4) 技術資料Ⅱ，「バイオゲン」三井東圧肥料㈱



- 5) Biddington, N.L. and Thomas, T.H. : *Planta*, **111**, 183 (1973).
- 6) 村上 浩, 植物の化学調節, **4**, 78 (1969).
- 7) 船田 良, 杉山民二, 久保隆生, 伏谷賢美 : 木材学会誌, **33**, 83 (1987).
- 8) Funada, R., Sugiyama, T., Kubo, T. and Fusitami, M. : *Plant Physiol.*, **88**, 525 (1988).
- 9) Sugiyama, T., Suze, S. and Hashizume, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 315 (1983).
- 10) Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J. : 'Growth & Differentiation in Plants' 3rd ed. Pergamon Press, 1981 p. 105~168.
- 11) 折谷隆志, 葭田隆治 : 日作紀, **38**, 459 (1969).